

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan studi eksperimental menggunakan *post test only control group design*.

4.2 Populasi dan Sample Penelitian

Pada penelitian ini digunakan embrio *zebrafish* yang diambil dari *zebrafish* dewasa dalam akuarium. Jumlah sampel kelompok dan perlakuan masing-masing adalah 60 telur yang di dapat dari 10 ekor zebrafish jantan dan 20 ekor zebrafish betina. Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *simple random sampling*.

Kriteria inklusi:

- a) Telur telah terfertilisasi
- b) Telur berusia kurang dari 2 *hpf*

Kriteria Eksklusi:

- a) Telur rusak / cacat morfologis (*Bleaching*)

Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan, yang terdiri dari:

- a) Kelompok yang diberi 0.56 ppm ekstrak *Moringa oleifera*
- b) Kelompok yang diberi 1.12 ppm ekstrak *Moringa oleifera*
- c) Kelompok yang diberi 2.24 ppm ekstrak *Moringa oleifera*
- d) Kelompok control tanpa pemberian ekstrak *Moringa oleifera*

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi FPIK UB, Laboratorium Fisiologi FKUB , dan Laboratorium Farmasi FKUB pada bulan Juni – Agustus 2016.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variable bebas yang digunakan yaitu dosis paparan *Moringa oleifera*.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang diamati adalah aktivitas motorik dan motilitas.

4.4.3 Variabel Kontrol

Variable kontrol dalam penelitian ini adalah penelitian embrio dalam kualitas air, suhu, timer, pencahayaan, dan paparan waktu *Moringa oleifera*.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan

- Zebrafish dewasa (*Danio rerio*) strain *wild-type* berwarna ungu
- Medium embrio yang terdiri dari 0.4% CaCl₂, 1.63% MgSO₄, 1% NaCl, dan 0.3% KCl dalam aqua destilata
- Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*)
- Tetramin Mini Flakes
- Artemia 0.5 gram

4.5.2 Alat

- Tangki akuarium dengan kapasitas 60L
- Heater
- Thermometer
- Filter akuarium
- Lampu
- Timer
- Tanaman artifisial

- Aerator
- Cawan petri
- Well *plate* 2x3
- Well *plate* 3x4
- Pipet plastic
- Kertas asturo berwarna hitam
- Kertas saring
- Tabung *falcon* 50 ml
- Kotak kayu berjala 45 x 50 cm
- Saringan dengan kerapatan 0.5mm
- Lampu Philip putih 36 watt
- Mikroskop trinokular Olympus CX-41

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Ekstrak Kelor (*Moringa oleifera*)

Ekstrak kelor yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari bubuk kasar 500 mesh yang berasal dari daun kelor (*Moringa oleifera*) yang diperoleh dari perkebunan kelor, Kelorina, Blora, Jawa Tengah. Daun kelor tersebut diekstraksi dengan teknik maserasi etanol 90% di Laboratorium Farmasi Universitas Brawijaya. Kemudian diencerkan dengan aquades menjadi dosis 0.56 ppm , 1,12 ppm , 2,24 ppm.

4.6.2 Medium Embrio

Medium embrio adalah medium yang digunakan untuk mengkultur telur hingga menjadi larva yang dibuat dari bahan CaCl_2 0,04%, NaCl 1%, MgSO_4 1,63%, dan KCl 0.03% yang dilarutkan dalam 100mL DW. Selanjutnya medium embrio dibagi menjadi 10 pengenceran dan diletakkan dalam cawan petri. (Kishida et.al., 1999)

4.6.3 Larva Zebrafish

Sampel dari penelitian ini adalah larva ikan zebra berusia 120 *hpf* yang berasal dari perkawinan indukan ikan zebra strain *Wild-Type*.

4.6.4 Aktivitas Lokomotor

Aktivitas lokomotor merupakan aktivitas berpindah tempat yang disertai dengan pergerakan seluruh tubuh pada saat proses perpindahan dari satu tempat ke tempat lain. Pengukuran aktivitas lokomotor dilakukan dengan meletakkan ikan pada well 3x4 yang telah di garis menjadi 4 bagian sama besar. Membiarkan ikan berenang dalam waktu 1 menit dan menghitung jumlah garis yang dilalui. Lalu membandingkan antara kontrol dan kelompok perlakuan.

4.6.5 Motilitas

Motilitas merupakan gabungan dari rangsangan motorik dan sensorik. Rangsangan keduanya mempengaruhi respon terhadap sensorik kulit dan rangsangan terhadap ekstremitis. Kedua stimulasi ini memberikan peran terhadap pertumbuhan dan perilaku. Pemberian stimulasi dilakukan dengan cara memberikan sentuhan menggunakan jarum pada bagian ekor ikan (Downes & Granato, 2006). Dinyatakan positif memiliki motilitas bila pada saat di sentuh ikan bergerak. Lalu membandingkan antara kontrol dan kelompok perlakuan.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pemeliharaan Ikan

Melakukan pemeliharaan ikan Zebrafish dewasa (5 *mpf*) yang akan dilakukan di akuarium berisi 60L air pada suhu 25-30 °C. Mengatur cahaya dengan periode terang selama 14 jam dimulai dari pukul 08.00 dan selama 10 jam periode gelap. Memberi makanan berupa artemia 0.5 gram diberikan saat pagi hari dan tetraamin 0.4 gram sebanyak dua kali pada siang dan sore hari (Reed dan Jennings, 2010).

4.7.2 Proses Peneluran Ikan dan Pengambilan Telur

Proses menelurkan akan dilakukan dengan meletakkan kotak kayu berjala berukuran 45x50 cm pada akuarium kosong yang telah di isi air bersih dan di aerator selama 1 hari. Selanjutnya, memindahkan ikan yang akan di telurkan pada akuarium tersebut dari akuarium asalnya pada pukul 12.00. Pada sore hari pukul 16.00 meletakkan hiasan akuarium dengan tujuan merangsang ikan agar dapat bertelur lebih banyak.

Proses peneluran akan dilakukan pada pukul 06.00 sebelum diberi makan. Selanjutnya memindahkan kembali ikan yang sudah dikembangbiakan ke akuarium semula menggunakan jaring ikan. Akuarium yang kosong tersebut kita sedot menggunakan teknik siphon dengan tujuan membuang air dan mengambil telur ikan. Pada saat membuang air, disaring juga dengan penyaring yang kerapatannya 0.5mm. Setelah itu memindahkan telur yang telah terseleksi ke cawan petri dan dibersihkan menggunakan air untuk menghilangkan debris (Aurora,2012).

4.7.3 Penentuan Dosis Ekstrak Daun Kelor

Dosis didapatkan dari penelitian sebelumnya oleh Bais *et al.* yang telah melakukan penelitian mengenai ekstrak daun kelor pada tikus (Bais *et al.*, 2014). Untuk penelitian ini, dilakukan konversi dosis dengan menggunakan perbandingan berat badan tikus dan zebrafish.

$$\frac{150 \text{ (berat rata – rata tikus)}}{200 \text{ }^{mg}/_{kgBB} \text{ tikus}} = \frac{0,42 \text{ (berat rata – rata zebrafish)}}{x}$$

$$x = 0,56 \text{ }^{mg}/_{kgBB} \text{ zebrafish}$$

sehingga didapatkan :

- dosis A = $0,56 \text{ }^{mg}/_{kgBB} = 0,56 \text{ ppm}$
- dosis B = $1,12 \text{ }^{mg}/_{kgBB} = 1,12 \text{ ppm}$
- dosis C = $2,24 \text{ }^{mg}/_{kgBB} = 2,24 \text{ ppm}$

4.7.4 Prosedur Ekstraksi Kelor

Ekstraksi daun kelor dilakukan oleh Laboratorium Farmasi FKUB, dengan

prosedur :

1. Menimbang 500 g serbuk daun kelor 500 mesh
2. Melarutkan serbuk kelor dengan 200 ml etanol 90%
3. Memaserasi larutan selama dua jam
4. Setelah dibiarkan selama 24 jam, larutan disaring
5. Me-remaserasi ampas dengan 150 ml etanol 90% selama dua jam
6. Setelah dibiarkan selama 24 jam, larutan disaring
7. Mengulangi langkah 5-6
8. Mencampur larutan yang dihasilkan
9. Melakukan rotav menggunakan rotary evaporator untuk mendapatkan

ekstrak daun kelor dalam bentuk pasta, dengan prosedur :

- a. Memasang kabel power *heating bath*, pompa vakum, dan rotary evapor pada stop kontak
- b. Memasukan ekstrak ke dalam labu atas bulat
- c. Mengisi *heating bath* dengan akuades
- d. Mengatur posisi sudut labu alas bulat hingga tercelup ke dalam *heating bath* dengan memutar tombol *clockwise*
- e. Mengalirkan air melalui *removing condenser*
- f. Menyalakan *heating bath* dengan menekan tombol *ON*
- g. Mengatur suhu *heating bath* dengan menekan tombol pengatur suhu
- h. Mengatur kecepatan rotasi dengan memutar tombol pengatur rotasi
- i. Menyalakan pompa vakum dengan menekan tombol *ON*
- j. Melakukan proses rotav hingga mendapatkan kepekatan ekstrak yang diinginkan
- k. Mematikan *heating bath* dengan menekan tombol *OFF*
- l. Menghentikan putaran rotary evapor dengan menekan tombol *OFF*
- m. Mematikan vakum dengan menekan tombol *OFF*
- n. Memindahkan ekstrak dari labu alas bulat ke cawan porselen.
- o. Membersihkan labu alas bulat
- p. Mengaliri *removing condenser* dengan air

- q. Mencabut kabel *power heating bath* dari stop kontak
- r. Membuang aquadest dari *heating bath*
- s. Mencabut kabel power pompa vakum dan rotary evapor dari stop kontak

4.7.5 Pengenceran Ekstrak Kelor

Pengenceran ekstrak daun kelor dilakukan oleh Laboratorium Faal FKUB dengan prosedur :

1. Menyiapkan tiga *falcon* berisi 50 ml akuades
2. Menimbang 0,028 mg, 0,056 mg dan 0,112 mg ekstrak daun kelor menggunakan timbangan analitik
3. Memasukkan hasil timbangan ekstrak daun kelor ke masing-masing falcon
4. Menghomogenkan larutan dengan vortex 1500 *rpm*

4.7.6 Pemeliharaan Embrio dan Paparan Ekstrak Daun Kelor

Telur yang telah dibersihkan diletakkan dalam cawan petri, lalu diamati secara langsung untuk menentukan apakah telur tersebut terfertilisasi atau tidak. Telur yang terfertilisasi pada bagian dalam cangkang terdapat bulatan yang berwarna lebih keruh dari tepinya. Pengamatan dilakukan tidak lebih dari 2 jam. Ekstrak kelor dilarutkan dalam aquades kemudian didilusi dalam medium embrio

sampai mencapai konsentrasi 0.56 ppm, 1.12 ppm dan 2.24 ppm. Telur diletakkan pada piring kultur 4 well (30 telur/8mL medium embrio beserta paparan ekstrak daun kelor dalam setiap well), dan diinkubasi pada suhu $28 \pm 0,5$ ° C. Medium embrio diganti satu kali setiap hari sesuai paparan yang diberikan dan dirawat sampai usia 72 jam setelah fertilisasi (kishida et.al., 1999).

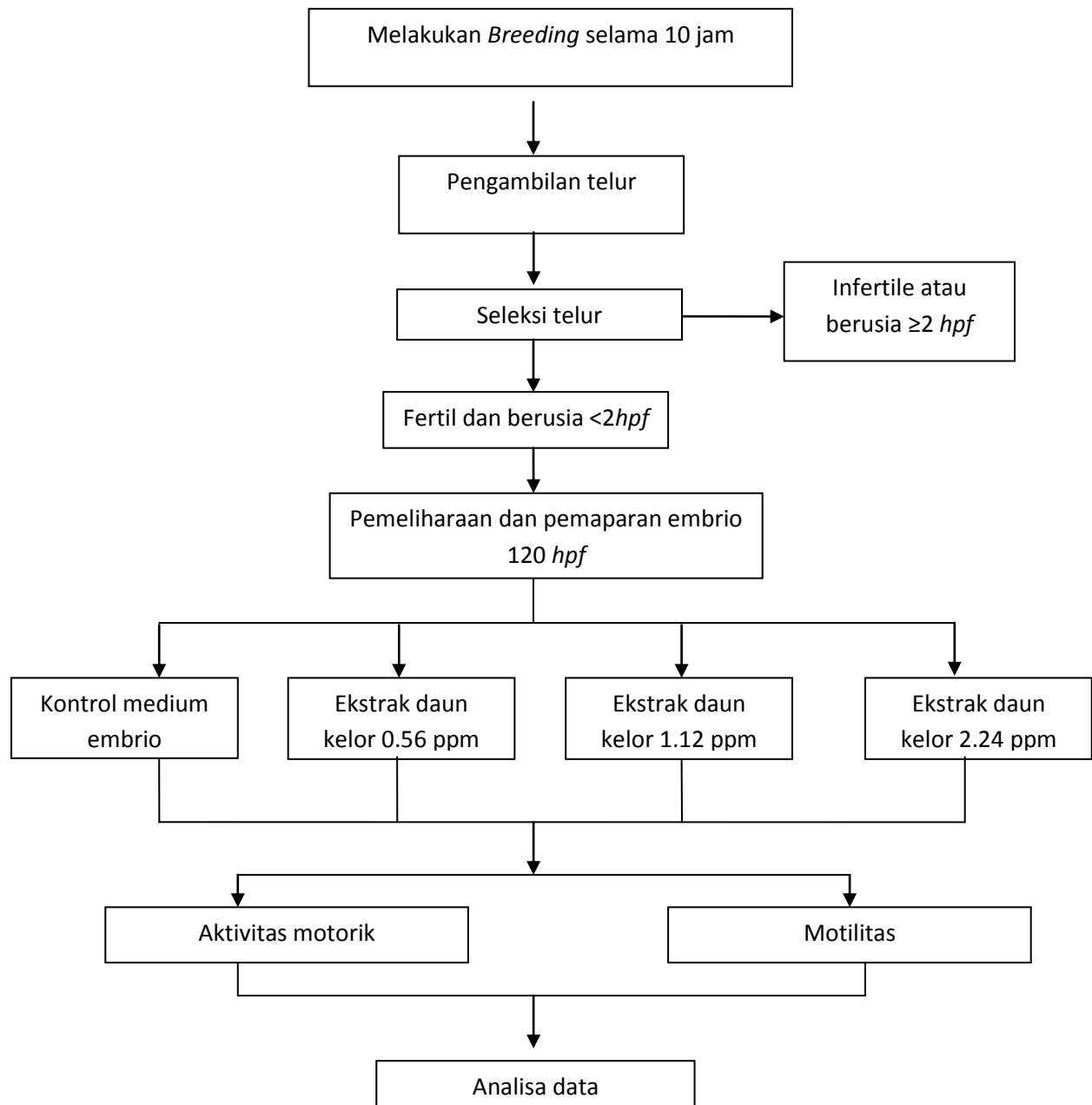
4.7.7 Pengukuran Aktivitas Lokomotor

Setelah embrio zebrafish berusia sekitar 120 hpf, dilakukan penghitungan gerakan lokomotor dengan meletakkan ikan pada well berukuran 3x4 yang digaris menjadi 4 bagian. Dalam waktu 1 menit melihat berapa jumlah garis yang dilewati. Lakukan pada semua sampel. Lalu bandingkan hasil dari kontrol dan yang di beri perlakuan.

4.7.8 Pengukuran Motilitas

Setelah dilakukan pengukuran aktivitas lokomotor, dilakukan pengukuran motilitas dengan cara menyentuh ujung jarum pada bagian ekor ikan zebra. Melihat apakah ada respon dari ikan zebra terhadap stimulasi tersebut. Bandingkan antara motilitas pada kelompok kontrol dan kelompok yang diberi perlakuan.

4.7.9 Alur Penelitian



4.8 Pengolahan Data

Setelah mendapatkan data aktivitas lokomotor dan motilitas (reflek taktil) embrio zebrafish , data diolah menggunakan *software SPSS for Windows 20.0* dan menyatakan dalam rerata \pm simpangan baku (mean \pm SD). Data dianalisis menggunakan uji analisis ANOVA, untuk mengetahui adanya perbedaan antara tiga kelompok perlakuan. Apabila terdapat perbedaan yang signifikan, dilanjutkan dengan menggunakan uji Post-hoc test untuk mengetahui letak perbedaan pada kelompok tersebut. Derajat kebermaknaan yang digunakan adalah $\alpha = 0,05$.

4.9 Jadwal Kegiatan

Tabel 4.1 Jadwal Kegiatan

No.	Kegiatan	Agustus			
		I	II	III	IV
1	Peneluran Pertama				
2	Perlakuan pertama				
3	Pengamatan Pertama				
4	Peneluran Kedua				
5	Perlakuan Kedua				
6	Pengamatan Kedua				
7	Peneluran Ketiga				
8	Perlakuan Ketiga				
9	Pengamatan Ketiga				